

褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基基因 *ATPSb* 的克隆与功能分析

冯娅琳, 郝培应*, 俞飞飞, 陆潮峰, 朱家骏, 俞晓平*

(中国计量大学生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

摘要:【目的】克隆褐飞虱 *Nilaparvata lugens* ATP 合酶 b 亚基基因全长 cDNA 序列, 并通过 RNA 干扰技术对该基因的功能进行研究, 探讨其在褐飞虱防治中的潜在价值。【方法】根据本实验室获得的褐飞虱转录组测序数据提供的 ATP 合酶 b 亚基基因部分核心序列信息, 以水稻品种 TN1 饲养的褐飞虱为材料, 应用 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE) 获得全长 cDNA; 通过实时荧光定量 PCR 技术研究其在褐飞虱不同发育阶段和 5 龄若虫不同组织中的表达谱; 并利用褐飞虱 2 龄若虫通过饲喂法对该基因进行 RNAi 实验。【结果】成功克隆了褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基基因 *ATPSb* 的全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: MF973493)。该序列包含一个 843 bp 的完整开放阅读框, 编码 280 个氨基酸。荧光定量 PCR 表明, *ATPSb* 基因的 mRNA 水平在褐飞虱不同发育阶段以 1–2 龄若虫期为高, 随着龄期增大呈下降趋势, 在雌成虫中也随着羽化时间增加而下降, 在雄成虫中的表达量高于雌成虫。在 5 龄若虫不同组织中的表达量以胸部中为最高, 头部、中肠、卵巢和脂肪体中相对表达量较低。从靶向 *ATPSb* 基因的 RNA 干扰第 6 天起, 处理组中靶标基因的 mRNA 水平降低, 并且 RNA 干扰对褐飞虱若虫具有显著致死效果; 在 RNA 干扰后第 18 天时, 对照组个体存活率仍保持在约 80% 的较高水平, 而饲喂 ds*ATPSb* 的 RNA 干扰组基本无个体存活。【结论】本研究结果显示, *ATPSb* 基因对褐飞虱的生存具有重要作用, 靶向 *ATPSb* 基因的 RNA 干扰对褐飞虱具有显著的抑制效果, *ATPSb* 基因可以作为褐飞虱防治的潜在靶标进行深入研究。

关键词: 褐飞虱; ATP 合酶; *ATPSb*; RNA 干扰; 存活率

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)05-0519-08

Molecular cloning and function analysis of ATP synthase b subunit gene *ATPSb* in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

FENG Ya-Lin, HAO Pei-Ying*, YU Fei-Fei, LU Chao-Feng, ZHU Jia-Jun, YU Xiao-Ping* (Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to investigate the functions of the ATP synthase b subunit gene in the rice brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* by RNAi and to explore the potential using the gene as a target to control this pest. 【Methods】 The full-length cDNA of ATP synthase b subunit gene was cloned from the BPH reared on rice variety TN1 by RACE according to the sequence information available in the transcriptome data previously obtained by our laboratory. The expression profiles of this gene in

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31672026, 31171860, 30900944); 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) 项目 (2012CB114100, 2010CB126200); 浙江省公益性技术应用研究计划项目 (2012C22041)

作者简介: 冯娅琳, 女, 1992 年 8 月生, 浙江台州人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学与生物化学, E-mail: 707794822@qq.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: yxp@cjl.u.edu.cn; haopei@163.com

收稿日期 Received: 2017-11-10; 接受日期 Accepted: 2018-02-02

different developmental stages and different tissues of the 5th instar nymphs of *N. lugens* were detected with real-time quantitative PCR, and the RNAi experiments of the gene were carried out with the 2nd instar nymphs of *N. lugens* by using feeding method. 【Results】 The full-length cDNA of the ATP synthase b subunit gene of the BPH named *ATPSb* (GenBank accession number: MF973493) was successfully cloned. It contains an ORF of 843 bp, encoding a protein of 280 amino acid residues. Real-time quantitative PCR showed that the *ATPSb* gene was highly expressed in the 1st and 2nd instar nymphs, and its relative expression level decreased with the developmental stage. The mRNA level of *ATPSb* was higher in male adults than that in female adults. In the 5th instar nymphs, the mRNA level of *ATPSb* in the thorax was the highest among different tissues, while relatively low in the head, midgut, ovary and fat body. The RNAi results showed that the mRNA level of *ATPSb* was significantly decreased in the ds*ATPSb* treatment group from the 6th day, and the RNAi treatment led to distinct mortality of the BPH nymphs. At 18 d after RNAi, the survival rate in the control group kept 80% , while no individual survived in the ds*ATPSb* treatment group. 【Conclusion】 The results suggest that the *ATPSb* gene is essential to the survival of the BPH, and the RNAi of *ATPSb* shows an effective inhibition of the BPH. *ATPSb* may serve as a potential target gene for BPH control.

Key words: *Nilaparvata lugens*; ATP synthase; *ATPSb*; RNA interference; survival rate

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål 是一种单食性水稻害虫,具有远距离迁飞特性和极强繁殖能力。褐飞虱主要通过取食水稻韧皮部汁液为害水稻,造成水稻生长延缓、分蘖延迟、空瘪粒增加,严重时全株死亡(Du *et al.*, 2009; 弓少龙和侯茂林, 2017)。此外,褐飞虱还可以传播多种水稻病毒,在我国福建、广东和广西地区,褐飞虱传播的齿叶矮缩病毒病和草状矮化病等时有发生严重发生(娄永根和程家安, 2011)。目前,对褐飞虱的应急防治主要以化学防治为主,但化学防治容易导致害虫的抗药性上升、稻米农药残留量增加、害虫再猖獗及环境污染等问题。选育和利用抗性品种也是褐飞虱防治的重要手段,但是,褐飞虱种群往往在与抗性品种的互作中发生致害性变异,形成能够适应抗性水稻的新种群(Huang *et al.*, 2017)。目前已鉴定的解毒酶和代谢酶等相关基因,尚不能很好地解释害虫抗药性产生或致害性变异的机制,对褐飞虱灾害还缺乏可持续的有效治理手段。因此,筛选与发现新的褐飞虱防治靶标,丰富褐飞虱防治的信息和手段具有重要的现实意义。

ATP 合酶(ATP synthase)由 F_0 和 F_1 两部分构成,在动物包括昆虫中主要参与氧化磷酸化过程中 ATP 的合成(Esparza-Perusquia *et al.*, 2017)。ATP 合酶 b 亚基是 ATP 合酶中保守性较低的亚基,主要起连接和固定 F_0 和 F_1 复合体的装配作用(周红娟, 2007)。ATP 合酶 b 亚基对于 ATP 合酶功能的正常发挥不可或缺,一旦其构象发生变化,将会影响 ATP

的合成(Kawasaki *et al.*, 2007)。研究发现,埃及伊蚊 *Aedes aegypti*(Paris *et al.*, 2012)和淡色库蚊 *Culex pipiens pallens*(王卫杰等, 2017)抗药性品系中的 ATP 合酶 b 亚基高表达,表明其可能与昆虫适应能力增强相关。陈亚娜(2015)和郑金晶(2013)的研究发现,ATP 合酶 b 亚基基因与果蝇的精巢发育相关,敲除之后会降低雄果蝇的繁殖力,造成雄性不育。Li 等(2013)发现 ATP 合酶 b 亚基能与对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)膜蛋白上的 VP292 相互作用,影响 WSSV 的感染。由此可知,ATP 合酶 b 亚基在生物的生长、繁殖以及适应性等方面发挥重要的作用。

本研究通过克隆褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基基因 *ATPSb* 的全长 cDNA 序列,采用荧光定量 PCR 方法检测其在褐飞虱中的时空表达格局,并应用 RNA 干扰技术研究其功能,探讨其在褐飞虱防治中的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 供试褐飞虱

供试褐飞虱为感虫水稻品种 TN1 上饲养的褐飞虱 Tn 种群,由本实验室在 TN1 上连续饲养 50 代以上,饲养温度为 $26 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度为 $80\% \pm 5\%$,光周期为 12L: 12D。

1.2 主要试剂

TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit,

TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit, PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser, DNA 2000 Marker, *Premix Taq*TM (TaKaRa *Taq*TM Version 2.0 Plus Dye) 和 SYBR Premix Ex Taq 均购自大连 TaKaRa 公司; SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit 购自美国 Clontech 公司; MEGAscript[®] T7 High Yield Transcription Kit 购自美国 Ambion 公司; 引物合成及基因测序由上海桑尼生物科技有限公司完成。

1.3 褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基基因 *ATPSb* 全长 cDNA 的克隆

收集 TN1 水稻上的褐飞虱若虫(1-5 龄)和羽化 1-9 d 的成虫混合材料,立即放入液氮中冻存。取样时若虫取 30~50 头,成虫取 5 头。使用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取总 RNA,具体步骤参照其说明书进行。使用琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000(Thermo)对 RNA 进行完整性及纯度检测。以 1 μg 总 RNA 为模板,使用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒反转录合成 cDNA 第 1 链,贮存于 -20℃ 备用。

根据本实验室的转录组测序序列信息,获得褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基基因的部分核心序列,并经 NCBI 网站序列比对鉴定。应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 ATPSb-F 和 ATPSb-R(表 1),以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,对该基因的核心序列进行验证。参照 Hao 等(2015)的方法进行褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基基因全长 cDNA 的克隆。PCR

扩增反应体系(50 μL): PCR Mix 25 μL, 10 μmol/L 正反向引物各 2 μL, cDNA 模板 2 μL, ddH₂O 19 μL。PCR 反应程序: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 3 min, 30 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit 回收目的 DNA 片段,连接到载体 pMD-18T 上 4℃ 过夜,连接产物转化到 JM109 感受态细胞,加 1 mL LB 液体培养基于 37℃ 震荡培养 2 h,取 200 μL 菌液涂布在含有 1% Amp 的 LB 固体培养基,倒置于 37℃ 培养 9 h。待菌落长出后随机挑取 5 个单菌落,接种于 1 mL(含 1% Amp)的 LB 液体培养基中,于 37℃ 摇床培养 12 h,取 1 μL 菌液进行菌液 PCR 鉴定,选取阳性克隆菌株后送到上海桑尼生物科技有限公司测序。测序结果用 DNAMAN 软件 and 原序列比对验证。

选取符合要求的 RNA 样品,用 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit User Manual 合成 5'-RACE 和 3'-RACE 的模板。分别设计外引物 ATPSb-5O/ATPSb-3O 以及内引物 ATPSb-5I/ATPSb-3I(表 1)。根据 RACE 试剂盒说明书,采用巢式 PCR 分别对目的基因的 3'端和 5'端进行扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳分离,回收目的 DNA 片段,连接 T 载体,转化大肠杆菌感受态细胞,筛选阳性克隆后送出测序。测序结果应用 DNAMAN 软件进行比对拼接获得 *ATPSb* 的全长 cDNA。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequences	引物用途 Use of primers
ATPSb-F	GTCCGCTACCTCTTCGTGC	cDNA 克隆 cDNA cloning
ATPSb-R	TCCAACCGCCTCTTGATTT	
ATPSb-5O	CGACTGGTAATCCAACCGCCTC	
ATPSb-5I	GCAGTGTCTTCTCCTCTCAAT	
ATPSb-3O	GTCCGCTACCTCTTCGTGCCTG	
ATPSb-3I	GAGCATTGAGGAGGAGAAGACA	
QATPSb-F	ACAAAGAGATTGAAGCCGAT	荧光定量 PCR qPCR
QATPSb-R	GCAGTGTCTTCTCCTCTCA	
QRPS11-F	ATGCGCGACATTCTTCCAGGTCC	
QRPS11-R	CCGATCGTGTGGCGTTGAAGGG	
dsATPSb-F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCGGCACCGAAGCGGCAACG	dsRNA 合成
dsATPSb-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGTGTATCGGCTTCAATCTCT	dsRNA synthesis

1.4 褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基的序列分析

测序后经拼接获得的 *ATPSb* 全长 cDNA 序列信息,利用开放阅读框分析软件(ORF finder <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测开放阅读框

及其编码的多肽,使用 NCBI Blastx 进行氨基酸序列同源性比对,使用在线工具 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)对蛋白质的分子量、理论等电点等进行预测,采用 SignalP 4.1 server (

www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) 对信号肽进行预测,采用在线工具 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 对蛋白质功能域进行预测。利用 MEGA5.0 软件中的邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建进化树,重复数为 1 000。

1.5 褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基基因的表达谱分析

利用荧光定量 PCR 技术检测 ATP 合酶 b 亚基基因在褐飞虱 Tn 种群中的相对表达量,其中,不同发育阶段的褐飞虱包括 1–2 龄若虫、3–4 龄若虫、5 龄若虫以及羽化后 1, 3, 5, 7 和 9 d 的雌成虫及雄成虫;不同组织材料分离自 5 龄末褐飞虱若虫,包括头、胸、中肠、卵巢和脂肪体。荧光定量 PCR 特异性引物为 QATPSb-F/QATPSb-R (表 1),以 RPS11 基因为内参 (Yuan *et al.*, 2014),检测褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基基因在各样品中的相对表达量。荧光定量 PCR 参考马艳等 (2013) 的反应体系及方法,其中退火温度改为 53℃。实验设 3 个生物学重复。

1.6 饲喂法进行 RNAi 实验

根据 cDNA 全长序列设计用于合成 dsRNA 干扰片段的引物 dsATPSb-F 和 dsATPSb-R (表 1),并在特异性引物 5' 端加保护碱基 (GGATCC) 及 T7 启动子 (TAATACGACTCACTATA)。为了不影响 RNAi 后的转录水平检测,干扰片段不包括荧光定量 PCR 检测的片段 (图 1)。按照 MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit (Ambion, 美国) 试剂盒说明书合成 dsRNA。采用 LiCl 沉淀法进行 dsRNA 的纯化:向 dsRNA 反应体系中加入 30 μ L ddH₂O 和 30 μ L LiCl Precipitation Solution, -20℃ 放置 1 h 左右,11 000 r/min 4℃ 离心 15 min,去上清后加入用 DEPC 水配制的 70% 乙醇 1 mL 进行洗涤,离心后去除乙醇,加入 20 μ L ddH₂O 溶解,放置 -20℃ 备用。

取饲养在 TN1 水稻品种上褐飞虱 2 龄若虫进行人工饲养,饲养条件参照 Fu 等 (2001) 的营养液配方,饲喂装置为两端覆盖双层 Parafilm 膜 (内含取食液 15 μ L) 的双通玻璃管 (2.5 cm $\times$ 15 cm),待试虫饲喂取食液适应 5 d 后,进行 RNA 干扰处理,纯化的 dsRNA 用取食液配制到终浓度为 0.5 μ g/ μ L。处理时,以取食液加入相应体积的 DEPC 处理水为对照组 (CK),每饲喂装置接入 20 头经过上述预适应处理且发育基本一致的褐飞虱若虫,设置 3 个重复。每天更换取食液,清理和统计死亡的褐飞虱个体,计算存活率。

此外,平行设置 RNA 干扰处理,每饲喂装置放

入 25 头发育一致的褐飞虱若虫,且两管作为一个重复,设置 3 个重复。每 2 d 对各组分别进行取样,每组取 6 头若虫,共取 5 次,包括 0, 2, 4, 6 和 8 d,并进行 RNA 的抽提及后续目的基因表达量的荧光定量 PCR 检测 (同 1.5 节)。

1.7 数据统计与分析

采用 WPS Excel 软件进行数据整理,运用 SPSS16.0 独立样本 *T* 检验对 RNA 干扰对 *ATPSb* 基因表达量及褐飞虱存活率的影响进行显著性差异分析,采用单因素分析中的 Tukey HSD 进行不同组织中 *ATPSb* 基因表达水平的数据分析。

2 结果

2.1 褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基基因的 cDNA 全长克隆及序列分析

以褐飞虱 cDNA 为模板扩增 ATP 合酶 b 亚基基因的核心片段,重组克隆测序结果表明,该扩增片段长度为 433 bp,与预期长度相符。Blast 搜索发现,克隆的褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基基因片段编码的多肽与桃蚜 *Myzus persicae* 的 ATP 合酶 b 亚基氨基酸序列一致性为 57%。应用 RACE 法扩增 cDNA 的 5' 端和 3' 端,分别获得 620 bp 5' 端序列和 556 bp 3' 端序列。利用 DNAMAN 软件对该基因的核心序列、5' 端及 3' 端片段进行拼接,得到 1 150 bp 全长 cDNA (图 1),并将该基因命名为 *ATPSb* (GenBank 登录号: MF973493)。通过 ORF Finder 分析发现褐飞虱 *ATPSb* 基因 cDNA 全长序列包含一个完整的 843 bp 的开放阅读框,编码 280 个氨基酸。ExPASy 软件分析表明,*ATPSb* 编码的蛋白分子量为 32.4 kD,等电点为 8.25,经 SignalP 4.1 Server 检测未发现内质网定位相关的信号肽,符合 ATP 合酶 b 亚基在细胞质翻译、定位线粒体的预期。利用 MEGA5.0 软件 NJ 法构建进化树,结果发现褐飞虱的 *ATPSb* 基因与点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 的 *ATPSb* 基因在同一分支上,且与桃蚜 *Myzus persicae* 的亲缘关系较近 (图 2)。

2.2 褐飞虱 *ATPSb* 基因的时空表达格局

荧光定量 PCR 检测表明,*ATPSb* 在褐飞虱 Tn 种群不同龄期均有不同程度表达。其中,在褐飞虱不同发育阶段以低龄 (1–2 龄) 若虫为最高,随着龄期增大呈下降趋势,5 龄若虫的表达量为 1–2 龄若虫的 0.58 倍;在雌成虫中,*ATPSb* 的 mRNA 水平也随着羽化时间增加而下降,羽化 1 d 的雌成虫约为羽化 9 d 时的 6 倍 (图 3: A)。在成虫中,雄成虫中

1 AGAGTACATGGGGCCCTGTGTCCTGTGATATTGGGTCTGGATCGTGAAGGGCAACAAGAA
61 AATGTTTTCCAGATTAGCTTTCAATTGCGCCAAACAGGTGCGGCCAGCCCTGATAGGTGC
1 M F S R L A F N C A K Q V R P A L I G A
121 AGTGCATGTCACGGCACCGAAGCGGCAACGTCGCAATCGCAACAGCTGATGAGCAAGGT
21 V R C S G T E A A T S Q S Q Q L M S K V
181 TGCCGTGATGGCACCAGCGCAGCCAGCCGACAGCTCTCGGCCACCGCCACCGGTGACCGCCC
41 A V M A P A A S R Q L S A T A T G D R P
241 GCCATGGGAGGGACCGAGCGTGACCTCGTCAACTTCCCCGCCCGTCATGCCCGAGGA
61 P W E G P E R D L V N F P R P V M P E E
301 GCGCGCAAGGTCCGCTACCTCTTCGTGCCTGAAGAGTGGTTCGAGTTCTTTTACAAGAA
81 P G K V R Y L F V P E E W F E F F Y K K
361 GACTGGTGTACTGGTCCTTACGTATTGGCTTTCGGTATTTTCAACTATGTAATGAGCAA
101 T G V T G P Y V L A F G I F N Y V M S K
421 AGAAGTGTGGTTAATTGAACACGAGTACTACTATGTTTATGCGCTGGCTGCCATCTTCTA
121 E V W L I E H E Y Y Y V Y A L A A I F Y
481 TTTTGGCGACAAGAAATTTGGAAAGCAATTTGGCGATTATTTGGACAAGAGATTGAAGC
141 F G D K K F G K Q I G D Y L D K E I E A
541 CGATACACATTCTTCGAAAAGGATAGGCTAGACAAGATAGCCAACCTCAACAAGAGCAT
161 D T H F F E K D R L D K I A N F N K S I
601 TGAGGAGGAGAAGACACTGCAGTGGCAGAAAGAGGCCGACAAGCTGATCATCGAAGCCAA
181 E E E K T L Q W Q K E A D K L I I E A K
661 ACGCGAGAACGTGCTCTGCAGCAGGAGGCCATTTTCAGAGAACGTGCCATGTTTCGCTA
201 R E N V A L Q Q E A I F R E R A M F A Y
721 CCAAGAAATCAAGAGGCGGTGGATTACCAGTCGCAGAAGCAGCTGATGGAGCGACGCAT
221 Q E I K R R L D Y Q S Q K Q L M E R R I
781 TGCGCAGAAGCACATGGTCGAATGGATCGTGGCCAACGTGCTGAAGGCCATCACCCGCA
241 A Q K H M V E W I V A N V L K A I T P Q
841 ACAGGAGGCCGACACACTCAAGAAGTGCATCGTCGATCTGCAGGCCATGTCAGCCAAGGC
261 Q E A D T L K K C I V D L Q A M S A K A
901 CTAAACCCCTCCCCCCCCTCCACTTTTAGTAAATTATATTCATCAACAACAATAAGTCATC
281 *
961 GGTAGAAATGTGTGGTGAACCTCAATCATGCAACCTGTCAACAGTAGAAGAGATGCATGAT
1021 GTGTGGTGAACCTACCGCCATGAATAAATGTCATAAATTCGAATTATGTTGAAAGCTAA
1081 TGTCTTTCGAACTGCTAATAAATTGTTATAGTTTATATCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1141 AAAAAAAAAA

图 1 褐飞虱 *ATPSb* 基因全长 cDNA 序列及氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and amino acid sequence of *ATPSb* from *Nilaparvata lugens*
起始密码子和终止密码子用粗体标识;加尾信号 (AATAAA) 用下划波浪线标识;RNA 干扰片段用下划直线标识;荧光检测片段用阴影标识。
The start and stop codons are in boldface, the polyadenylation signal sequence (AATAAA) is underlined with wavy line, the RNA interference fragment is underlined with straight line, and the fluorescence detection segment is shown in shadow.

的表达量明显高于雌成虫 (图 3: B)。在 5 龄褐飞虱若虫中,*ATPSb* 在不同组织部位的表达量以胸部中为最高,头部、中肠、卵巢和脂肪体中表达量较低 (图 4)。褐飞虱的胸部有飞行和跳跃器官,含有丰富的肌肉,可能所需能量较多,因而 *ATPSb* 表达量较高;而 5 龄若虫的卵巢中还没有启动卵的发育,所需的能量可能不高,因而 *ATPSb* 表达量较低。

2.3 饲喂 dsRNA 对褐飞虱体内 *ATPSb* 表达水平的影响

荧光定量 PCR 检测结果显示,饲喂 0.5 μg/mL ds*ATPSb* 的 RNA 干扰组,*ATPSb* 基因的 mRNA 水平

总体呈现连续性下降。与对照组相比,ds*ATPSb* 干扰组在处理 6 d 时,*ATPSb* 基因的 mRNA 水平约为对照组的 50%,二者之间的差异显著 ($P < 0.05$);饲喂 8 d 时,mRNA 的水平继续降低,减少至对照组的 40% ($P < 0.05$) (图 5)。结果表明,靶向 *ATPSb* 基因的 RNA 干扰显著降低了靶标基因的表达量,取得了预期效果。

2.4 *ATPSb* 基因的 RNA 干扰对褐飞虱存活率的影响

在 RNA 干扰实验中,连续喂养 ds*ATPSb* 处理对褐飞虱存活率产生了显著的影响。从 RNA 干扰的

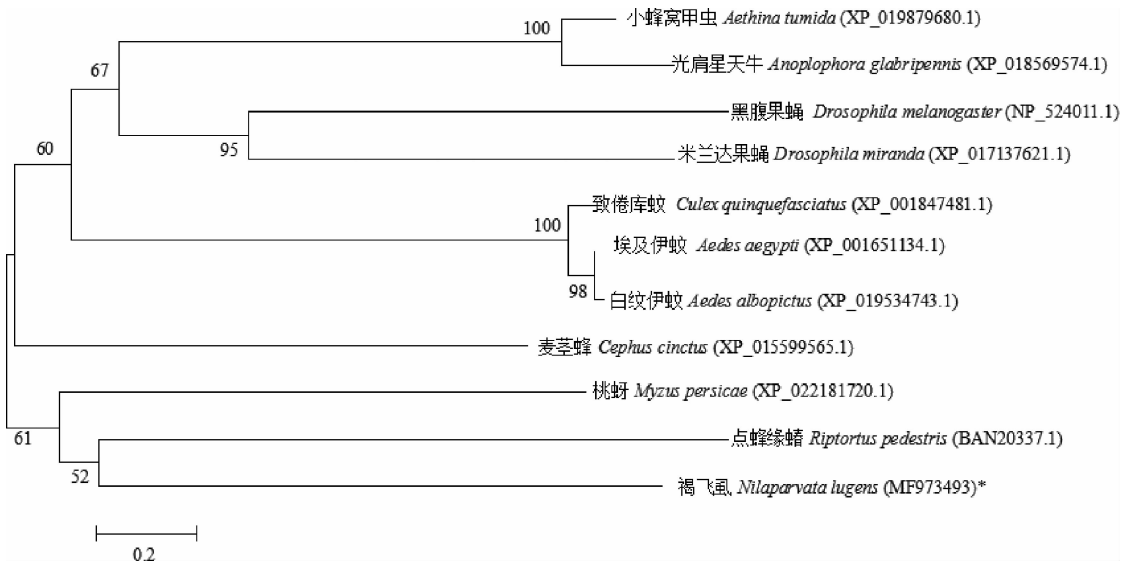


图2 基于氨基酸序列构建的褐飞虱及其他昆虫 *ATPSb* 的进化树(邻接法)
Fig. 2 Phylogenetic tree of *ATPSb*s from *Nilaparvata lugens* and other insects based on amino acid sequence with neighbor-joining method

分支节点上的数字表示1 000次自举检验得到的 Bootstrap 值;比例尺表示每个位点的氨基酸替换数。Numbers on the branches indicate the bootstrap values with 1 000 replicates. The bar indicates the estimated number of substitutions per site.

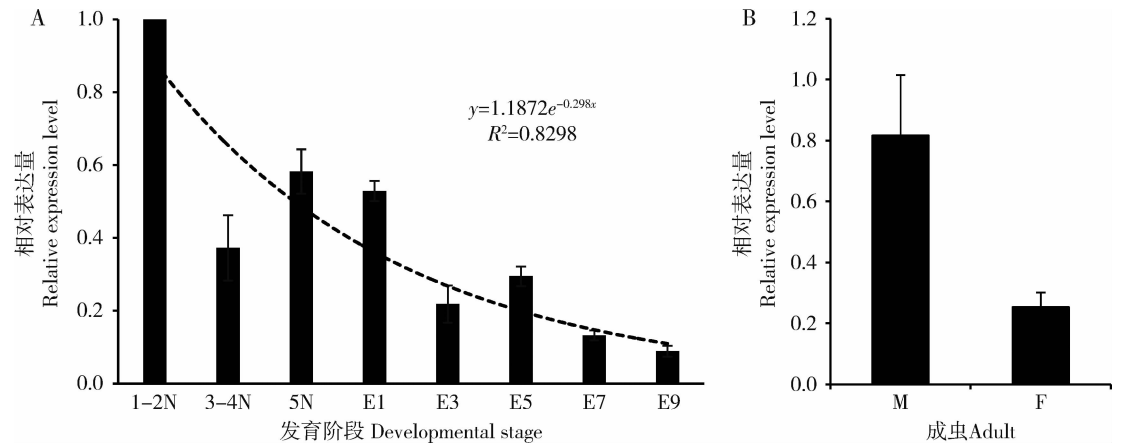


图3 褐飞虱 *ATPSb* 基因在褐飞虱不同发育时期(A)和雌雄成虫(B)中的表达水平

Fig. 3 Expression level of *ATPSb* gene in different developmental stages (A) and female and male adults (B) of *Nilaparvata lugens* 1-2N: 1-2龄若虫 1st-2nd instar nymph; 3-4N: 3-4龄若虫 3rd-4th instar nymph; 5N: 5龄若虫 5th instar nymph; E1-9: 分别为羽化后 1-9 d的雌成虫 1-9 d-old female adult, respectively; M: 雄成虫 Male adult; F: 雌成虫 Female adult. 图中数据为3次重复的平均值±标准差。Data in the figure are presented as mean ± SD of three independent experiments.

第6天开始,喂食 *dsATPSb* 的处理组与对照组就达到了显著差异($P < 0.05$),第12天时,达到了极显著差异($P < 0.01$)。到第18天时,处理组基本无个体存活,但对照组仍有80%的个体存活(图6)。由此可见,*ATPSb*对褐飞虱的生存具有重要的意义,干扰 *ATPSb* 基因对褐飞虱正常的生理活动产生了极大影响。

3 讨论

本研究克隆了褐飞虱 ATP 合酶 b 亚基基因

ATPSb 的全长 cDNA 序列,探明了该基因在褐飞虱不同生长发育阶段的表达格局。靶向 *ATPSb* 基因的 RNA 干扰可以导致褐飞虱死亡,效果极显著,提示以该基因作为靶标在褐飞虱防治方面具有较大的潜力。

ATP 合酶产生的 ATP 为有机体各项生命活动的重要能量来源,因此 ATP 合酶功能的正常发挥对于维护生物体的正常生命活动具有重要意义。本研究中,*ATPSb* 基因的 RNA 干扰降低了其 mRNA 的水平,导致褐飞虱发生极显著死亡,表明 *ATPSb* 基因

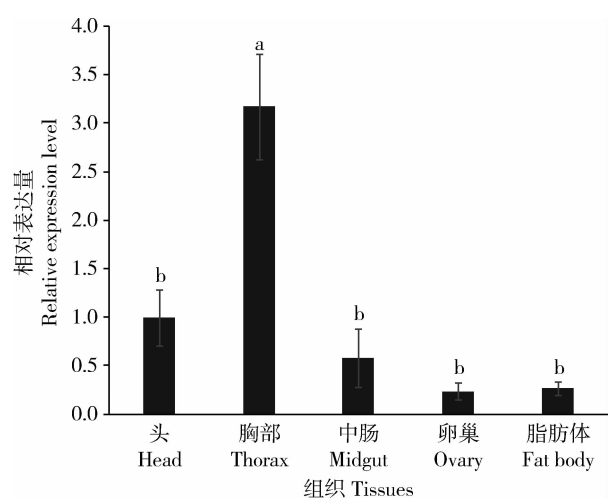


图4 *ATPSb* 基因在褐飞虱 5 龄若虫不同组织中的相对表达水平

Fig. 4 Relative expression level of *ATPSb* gene in different tissues of the 5th instar nymphs of *Nilaparvata lugens*

图中数据为 3 次重复的平均值 $\pm$ 标准差, 数据分析采用单因素分析中的 Tukey HSD 进行, 柱上不同字母表示在统计分析上不同组织间存在显著差异 ($P < 0.05$)。Data in the figure are presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey HSD, and different letters above bars indicate significant differences among different tissues ($P < 0.05$).

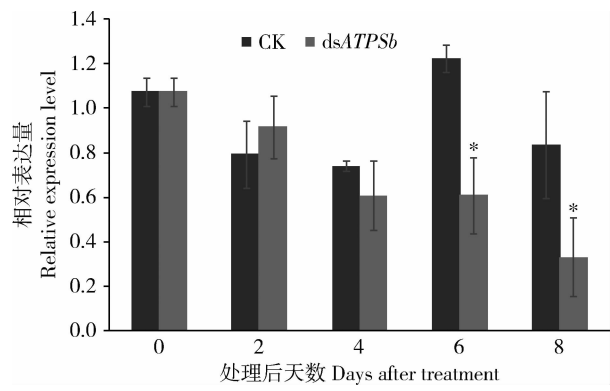


图5 饲喂 dsRNA 对褐飞虱若虫体内 *ATPSb* 基因表达的抑制效果

Fig. 5 Inhibition effect of feeding dsRNA on the expression level of *ATPSb* gene in *Nilaparvata lugens* nymphs

CK: 饲喂 DEPC 处理水的对照组 Control group (feeding DEPC-treated water). 图中数据为 3 次重复的平均值 $\pm$ 标准差, 星号表示在统计分析上处理组与对照组之间存在显著差异 (T 检验, $P < 0.05$)。Data in the figure are presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. Asterisk means significant difference between the dsATPSb treatment group and CK at the 0.05 level (T -test).

对褐飞虱的生存具有重要作用, 可以作为褐飞虱防治的潜在靶标做进一步深入研究。与之类似, 南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 的线粒体 ATP 合酶

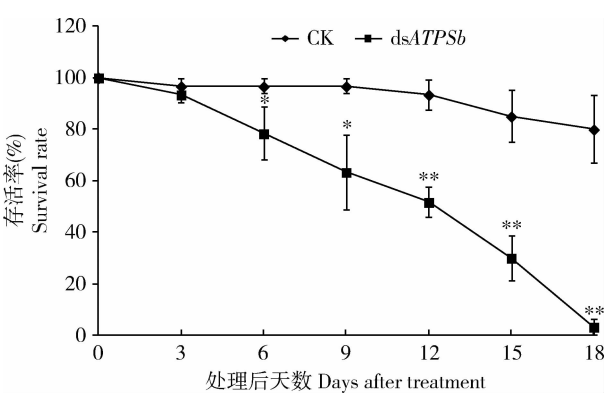


图6 *ATPSb* 基因的 RNA 干扰对褐飞虱若虫存活率的影响

Fig. 6 Effect of the RNAi of *ATPSb* on survival rate of *Nilaparvata lugens* nymphs

CK: 饲喂 DEPC 处理水的对照组 Control group (feeding DEPC-treated water). 图中数据为 3 次重复的平均值 $\pm$ 标准差, 星号表示在统计分析上处理组与对照组之间存在显著差异 (T 检验, $P < 0.05$), 双星号表示在统计分析上处理组与对照组之间存在极显著差异 (T 检验, $P < 0.01$)。Data in figure are presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. Single asterisk means significant difference between the dsATPSb treatment group and CK at the 0.05 level (T -test), and double asterisk means extremely significant difference between the dsATPSb treatment group and CK at the 0.01 level (T -test).

b 亚基基因的敲除可以防治根结线虫病 (Huang *et al.*, 2013)。*ATPSb* 基因的 RNA 干扰导致褐飞虱死亡的具体作用机制还不是很明确。推测其可能的机制为: *ATPSb* 基因的 RNA 干扰降低了其 mRNA 的水平, 进而会影响 ATP 合酶 b 亚基蛋白的合成和 ATP 合酶的正常组装及 ATP 的合成。后续工作可以进一步测定 *ATPSb* 基因的 RNA 干扰对 ATP 合酶 b 亚基蛋白水平的影响以及 ATP 的产生情况, 以明确 dsATPSb 影响褐飞虱生存能力的机制。

本研究在实际操作过程中发现, 对照组在实验开始后的第 8 天即有个体开始羽化, 到第 12 天时已经全部羽化, 而连续饲喂 dsATPSb 的 RNA 干扰组中, 很少有个体能够存活到成虫期, 因而无法从实验组取到足够的褐飞虱成虫样本, 致使有关 *ATPSb* 的 RNA 干扰对褐飞虱生殖能力等影响的信息尚不明确, 这也从侧面说明了该基因对褐飞虱的重要性。dsATPSb 处理的褐飞虱在第 18 天时存活率接近于 0, 尽管持续时间跨度比较长, 但处理试虫的发育历期明显推迟, 体型偏小, 基本没有个体羽化。这样, 既可以减轻褐飞虱当代的为害, 也从根本上控制了下一代的种群数量, 因此, *ATPSb* 基因对探索褐飞虱防治新途径具有重要价值。在后续的研究中, 可以

适当推迟开始 RNAi 时间,选取虫龄较大的试虫,以获得足够数量 *ATPSb* 表达量被敲减的成虫,通过设置不同的雌雄虫交配组合(干扰与未干扰),测定其子代的孵化数量及发育情况,探明 *ATPSb* 表达量敲减对雌虫或雄虫生殖能力的影响。

本研究初步探明了 ATP 合酶 b 亚基基因 *ATPSb* 在褐飞虱生长发育过程的表达格局及其在褐飞虱生存方面的作用。今后,可以针对 *ATPSb* 基因开展更多研究,比较不同干扰策略,包括饲喂法和注射法、dsRNA 干扰和 siRNA 干扰等,从中筛选更为有效的干扰条件,优化防治褐飞虱的方法。

参考文献 (References)

Chen YN, 2015. The Effects of Knockdown of *ATPsyn-b* on Spermiogenesis and Larval Growth in *Drosophila*. MSc Thesis, Central China Normal University, Wuhan. [陈亚娜, 2015. *ATPsyn-b* 基因敲降对果蝇精子发生和幼虫生长的影响. 武汉: 华中师范大学硕士学位论文]

Du B, Zhang W, Liu B, Hu J, Wei Z, Shi Z, He R, Zhu L, Chen R, Bin H, He G, 2009. Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(52): 22163–22168.

Esparza-Perusquía M, Olvera-Sánchez S, Pardo JP, Mendoza-Hernández G, Martínez F, Flores-Herrera O, 2017. Structural and kinetics characterization of the F₁F₀-ATP synthase dimer. New repercussion of monomer-monomer contact. *BBA Bioenerg.*, 1858(12): 975–981.

Fu Q, Zhang Z, Hu C, Lai F, Sun Z, 2001. A chemically defined diet enables continuous rearing of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 36(1): 111–116.

Gong S, Hou M, 2017. Research progress on rice varietal resistance to the brown planthopper and white-backed planthopper. *Plant Prot.*, 43(1): 15–23. [弓少龙, 侯茂林, 2017. 水稻对褐飞虱和白背飞虱的抗性及其机制研究进展. 植物保护, 43(1): 15–23]

Hao P, Lu C, Ma Y, Xu L, Zhu J, Yu X, 2015. Roles of *NIKTIP* in the growth and eclosion of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, as revealed by RNA interference. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(9): 22888–22903.

Huang HJ, Liu CW, Xu HJ, Bao YY, Zhang CX, 2017. Mucin-like protein, a saliva component involved in brown planthopper virulence and host adaptation. *J. Insect Physiol.*, 98: 223–230.

Huang Y, Mei M, Shen B, Mao Z, Xie B, 2013. RNAi of *MiASB* caused high mortality of *Meloidogyne incognita* juveniles and inhibited the nematode disease. *Agric. Sci.*, 4(9): 483–490.

Kawasaki I, Hanazawa M, Gengyo-Ando K, Mitani S, Maruyama I, Iino Y, 2007. ASB-1, a germline-specific isoform of mitochondrial ATP synthase b subunit, is required to maintain the rate of germline development in *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Dev.*, 124(3): 237–251.

Li Q, Liu QH, Huang J, 2013. F₀ATP synthase b-chain of *Litopenaeus vannamei* involved in White Spot Syndrome Virus infection. *Virus Genes*, 47(1): 42–48.

Lou YG, Cheng JA, 2011. Basic research on the outbreak mechanism and sustainable management of rice planthoppers. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 48(2): 231–238. [娄永根, 程家安, 2011. 稻飞虱灾变机理及可持续治理的基础研究. 应用昆虫学报, 48(2): 231–238]

Ma Y, Hao PY, Lu CF, Yu XP, 2013. Molecular cloning and function analysis of cuticular protein gene *NIICP* in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 56(11): 1244–1251. [马艳, 郝培应, 陆潮峰, 俞晓平, 2013. 褐飞虱表皮蛋白基因 *NIICP* 的克隆及功能研究. 昆虫学报, 56(11): 1244–1251]

Paris M, Melodelima C, Coissaca E, Tetreau G, Reynaud S, David JP, Despres L, 2012. Transcription profiling of resistance to *Bti* toxins in the mosquito *Aedes aegypti* using next-generation sequencing. *J. Invertebr. Pathol.*, 109(2): 201–208.

Wang WJ, Liu XY, Fang FJ, Guo Q, Wang H, Qi LL, Zhao WA, 2017. Cloning and sequence analysis of ATP synthase B subunit gene and its association with delatmathrin resistance in *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). *Acta Entomol. Sin.*, 60(8): 900–905. [王卫杰, 刘新颖, 方福瑾, 过琴, 王贺, 齐莉莉, 赵文爱, 2017. 淡色库蚊 ATP 合酶 B 亚基基因克隆和序列分析及其与溴氰菊酯抗性的关系. 昆虫学报, 60(8): 900–905]

Yuan M, Lu Y, Zhu X, Wan H, Shakeel M, Zhan S, Jin BR, Li J, 2014. Selection and evaluation of potential reference genes for gene expression analysis in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) using reverse-transcription quantitative PCR. *PLoS ONE*, 9(1): e86503.

Zheng JJ, 2013. The Effects of Knockdown of *ATPsyn-b* and *Mst84Db* on Male Fertility in *Drosophila*. MSc Thesis, Central China Normal University, Wuhan. [郑金晶, 2013. *ATPsyn-b* 和 *Mst84Db* 基因敲降对雄果蝇繁殖力的影响. 武汉: 华中师范大学硕士学位论文]

Zhou HJ, 2007. The Relationship between the Cell Cycle and the Localization of *Clonorchis sinensis* ATP Synthase b Chain. MSc Thesis, Sun Yat-Sen University, Guangzhou. [周红娟, 2007. 华支睾吸虫 ATP 合酶 b 亚基的定位与细胞周期的关系. 广州: 中山大学硕士学位论文]

(责任编辑: 马丽萍)